



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Síntesis de glicopéptidos modificados derivados de la MUC1

Autor/es

AINARA MARTÍNEZ ROYO

Director/es

FRANCISCO CORZANA LÓPEZ y ESTER JIMÉNEZ MORENO ,

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2018-19



Síntesis de glicopéptidos modificados derivados de la MUC1, de AINARA
MARTÍNEZ ROYO

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative
Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los
titulares del copyright.



TRABAJO FIN DE GRADO

Síntesis de glicopéptidos modificados derivados de la MUC1

*Synthesis of modified glycopeptides derived
from MUC1*

Ainara Martínez Royo

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de ciencia y tecnología

Área de química orgánica

2018-2019

Tutores:

Ester Jiménez Moreno

Francisco Corzana López

Contenido

1. ABREVIACIONES	2
2. RESUMEN	5
3. INTRODUCCIÓN	8
4. OBJETIVOS	11
5. ANTECEDENTES.....	13
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	18
1. SÍNTESIS DE Tn.....	19
2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MEDIANTE SPPS.....	25
3. ANALISIS MICROARRAY.....	26
7. CONCLUSIONES	28
8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	30
9. ANEXO. ESPECTROS DE RMN.....	39

1. ABREVIACIONES

δ	desplazamiento químico
$^{\circ}\text{C}$	grado Celsius
mL	mililitro
^1H RMN	resonancia magnética nuclear de protón
^{13}C RMN	resonancia magnética nuclear de carbono
Ac	acetilo
AcOEt	acetato de etilo
CDCl_3	cloroformo deuterado
CH_3CN	acetonitrilo
d	doblete
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
Et_2O	éter dietílico
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
DMAPA	3-dimetilaminopropilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
g	gramo
h	hora
Hz	herzio
MHz	megahertzio
J	constante de acoplamiento
m	multiplete
min	minutos
mmol	milimol
M	molaridad
MeOH	metanol
NaHCO_3	carbonato de sodio
q	cuartete
R	grupo alquilo
RMN	resonancia magnética nuclear

s	singlete
Ser	serina
Suc	succinimida
SPPS	del inglés: <i>solid phase peptide synthesis</i>
t.a.	temperatura ambiente
^tBu	<i>terc</i> -butilo
TACAs	del inglés: <i>tumor-associated carbohydrate antigens</i>
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
Thr	treonina
μM	micromolar
Nle	norleucil
TMSOTf	trifluorometanosulfonato de trimetilsililo
GalNAc	N-acetilgalactosamina
APDTRP	Secuencia peptídica Arg-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro
APETRP	Secuencia peptídica Arg-Pro-Glu-Thr-Arg-Pro

2. RESUMEN

El cáncer es hoy en día una enfermedad severa y difícil de tratar y constituye una de las principales causas de muerte en el primer mundo. Se caracteriza por un desequilibrio entre crecimiento y muerte de las células. Actualmente, los métodos de tratamiento son invasivos y no siempre son eficaces, por lo que la búsqueda de terapias alternativas es un objetivo prioritario. Dentro de estas alternativas, la inmunoterapia es una de las estrategias más prometedoras ya que son las células del propio sistema inmunitario del paciente las que reconocen y eliminan las células tumorales con una alta especificidad.

Uno de los principales biomarcadores de cáncer es la mucina MUC1. Esta glicoproteína se encuentra en la superficie de células y se caracteriza por presentar cadenas largas de carbohidratos altamente ramificadas en las células sanas. Por el contrario, en células tumorales los carbohidratos son muy sencillos. Como consecuencia, se exponen distintos antígenos capaces de desencadenar una respuesta inmune y que son reconocidos por los anticuerpos anti-MUC1. Un grupo importante de estos antígenos son los denominados TACAs (del inglés *tumor-associated antigens*), como el antígeno Tn, que consiste en un residuo de serina o treonina unido mediante un enlace α -O-glicosídico a una unidad de N-acetilgalactosamina (GalNAc)

Estas características convierten a esta proteína en una diana para el desarrollo de nuevas vacunas terapéuticas para el tratamiento del cáncer. Por otro lado, muchos de los pacientes con cáncer desarrollan anticuerpos anti-MUC1. Gracias a ello, la MUC1 es también una candidata ideal para el desarrollo de biosensores que permitan un diagnóstico temprano de esta enfermedad.

Dada la importancia de esta mucina, en este trabajo se ha sintetizado un derivado natural de la MUC1 en el que el residuo de aspártico de la secuencia natural ha sido sustituido por glutámico, con el objetivo de evaluar el efecto de dicha modificación en la afinidad de un anticuerpo anti-MUC1. El desarrollo de péptidos con una mayor afinidad por dichos anticuerpos podría conducir a la generación de nuevos biosensores capaces detectar cantidades menores de anticuerpos en pacientes y, por lo tanto, a un diagnóstico más temprano. Además, el nuevo péptido podría ser utilizado como antígeno para el desarrollo de nuevas vacunas para tratar el cáncer.

Cancer is still one of the most severe and difficult to treat set of diseases with one of the highest mortality rates, in which an imbalance between the growth and death of cells is at the onset of the disease. Nowadays, cancer treatment is still invasive, and it is not always effective. Therefore, new treatment strategies are highly needed. Among these new alternatives, immunotherapy is one of the most promising strategies, as it exploits the ability of the patient immune system to recognize and eliminate tumor cells with a high specificity.

One of the most studied biomarkers for cancer is mucin MUC1. This glycoprotein is located on the surface of cells and in healthy cells presents long highly branched chains of oligosaccharides, while in carcinogenic cells these glycans are rather simple. This exposes antigens able to trigger an immune response called TACAs (tumor-associated antigens), as Tn antigen. Tn antigen consists of a serine or threonine residue which has a N-acetilgalactosamine attached through an α -O-glycosidic linkage.

The differences that MUC1 presents between healthy and tumoral cells and its ability to trigger immune responses turn this protein into an interesting target for the development of new therapeutic vaccines for cancer treatment. On the other hand, cancer patients usually generate anti-MUC antibodies. Due to this, MUC1 is also an idea target for the development of biosensors for an early diagnosis of the disease.

Given the importance of this mucin, in this work a natural derivative of MUC1 has been synthesized, in which an aspartic residue of the natural sequence has been substituted by a glutamic acid with the aim to evaluate the affinity of this new peptide against an anti-MUC1 antibody. The development of peptides with an increased affinity for anti-MUC1 antibodies could lead to the design of new biosensors able to detect lower amounts of antibodies in cancer patients, and thus, to an early-stage detection of the disease. Additionally, the new peptide could be used as an antigen for the development of vaccines to treat cancer.

3. INTRODUCCIÓN

El cáncer puede definirse como un conjunto de enfermedades en el cual las células tumorales, a diferencia de las sanas, adquieren la capacidad de multiplicarse y diseminarse de una forma descontrolada. Este desequilibrio entre proliferación y muerte de las células genera conglomerados celulares a los que se les llama tumores.¹

Los tratamientos tradicionalmente empleados para tratar el cáncer incluyen cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, la alta invasividad y la gran cantidad de efectos secundarios que conllevan estos métodos, en los cuales son atacadas tanto células tumorales como sanas, hacen necesaria la búsqueda de nuevos métodos alternativos tanto de terapia como de diagnóstico temprano.

La inmunoterapia, en la cual el propio sistema inmunitario del paciente identifica y elimina las células tumorales de manera selectiva, es actualmente uno de los enfoques emergentes más prometedores para el tratamiento de esta enfermedad.

Uno de los biomarcadores más estudiados en el cáncer es la glicoproteína MUC1. Esta proteína está altamente glicosilada y se encuentra en la superficie de las células epiteliales.² Su dominio extracelular está constituido por una serie de repeticiones de una secuencia de 20 aminoácidos (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA) que presenta 5 posibles puntos de glicosilación (tres treoninas y dos serinas).³ En células sanas dichos carbohidratos forman cadenas largas y ramificadas, mientras que en células tumorales los carbohidratos están truncados, siendo más cortos y sencillos. Esto genera que determinados antígenos, como los denominados TACAs (del inglés *tumor-associated carbohydrate antigens*) queden expuestos, facilitando el acceso y reconocimiento por el sistema inmune (Figura 1).⁴

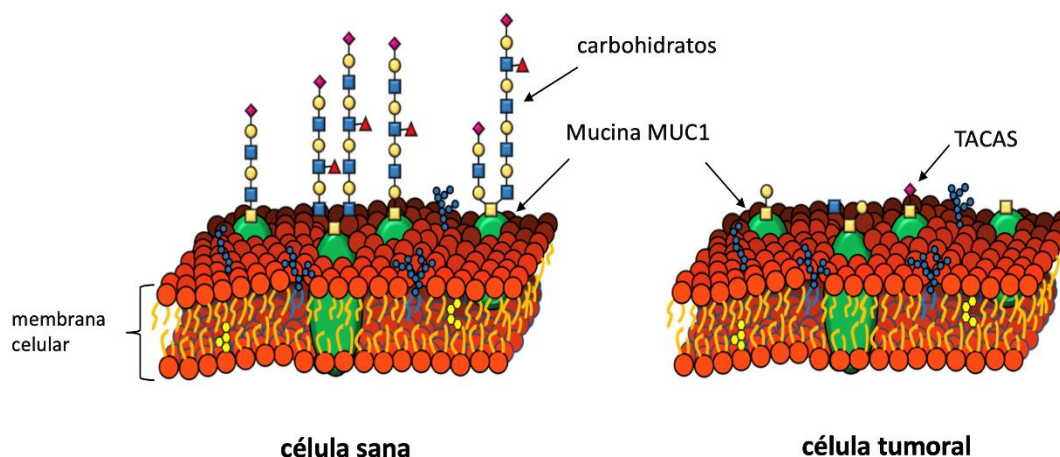


Figura 1. Diferencias en la estructura química de la MUC1 entre una célula sana y una tumoral.

¹ Instituto Nacional del cáncer. <http://www.cancer.gov/espanol> (visitado el 25 de junio de 2019).

² J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Mucins and Cancer*, Future Medicine Ltd, Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK, **2013**.

³ Mingjing, L.; Fan, Y.; Chao, Y.; Peng, G.; Younghui, L.; Wei, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 993-999

⁴ C. Fu, H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng, H. Chen, *HLA* **2016**, *88*, 275-286.

Uno de los TACAs que más interés ha generado es el antígeno Tn (α -O-GalNAc-Ser/Thr)⁵ presente en mucinas como MUC1 (Figura 2). También cabe destacar que es el fragmento peptídico Pro-Asp-Thr-Arg-Pro (PDTRP) de esta mucina el que actúa como antígeno y es reconocido por los llamados anticuerpos anti-MUC1.⁶ Esto ha hecho que la MUC1 se haya convertido en una diana clave para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer.^{7,8}

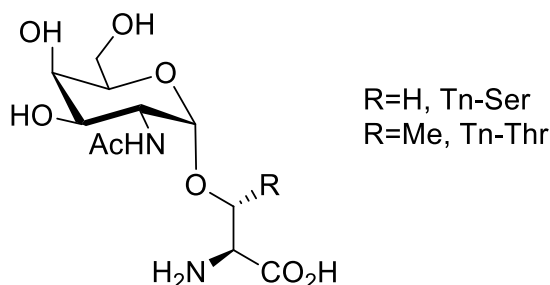


Figura 2. Estructura del antígeno Tn.

Diversos estudios realizados hasta la fecha demuestran la presencia de anticuerpos anti-MUC1 en pacientes de cáncer, lo que puede indicar un pronóstico favorable ya que dichos anticuerpos pueden restringir el crecimiento y expansión del tumor.^{9,10} El estudio de estos anticuerpos pueden ser utilizados para la detección temprana de tumores. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha no han tenido éxito en la detección precoz del cáncer y no existe en la actualidad ningún ensayo comercial para la localización de estos anticuerpos en suero humano.¹¹

Por otra parte, la MUC1 también podrían contribuir al diseño y mejora de los actuales tratamientos para el cáncer, mejorando su eficacia y disminuyendo sus efectos secundarios mediante la generación de vacunas terapéuticas. Una de las estrategias empleadas hasta la fecha en este campo se ha basado en el diseño de miméticos de Tn con aminoácidos no naturales.¹²

Dentro de este campo, este trabajo se centrará en la síntesis de derivados naturales de la MUC1 con el objetivo de mejorar su afinidad por los anticuerpos anti-MUC1, basándonos en que aquellos antígenos que presenten buena afinidad por dichos anticuerpos serán buenos candidatos para poder ser utilizados como biosensores en la detección temprana de tumores.

⁵ T. Ju, V. I. Otto, R. D. Cummings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1770–1791

⁶ U. Karsten, N. Serttas, H. Paulsen, A. Danielczyk, S. Goletz, *Glycobiology* **2004**, 14, 681–692.

⁷ R. M. Wilson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 14462–14472

⁸ N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4421–4442.

⁹ O. Blixt, D. Bueti, B. Burford, D. Allen, S. Julien, M. Hollingsworth, A. Gammerman, I. Fentiman, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Breast Cancer Res.* **2011**, 13, R25

¹⁰ Y. Hamanaka, Y. Suehiro, M. Fukui, K. Shikichi, K. Imai, Y. Hinoda, *Int. J. Cancer* **2003**, 103, 97–100.

¹¹ Miles, D.; Rocho, H.; Martin, M.; Perren, T. J.; Cameron, D. A.; Glaspy, J.; Dodwell, D.; Parker, J.; Mayordomo, J.; Tres, A.; Murray, J. L.; Ibrahim, N. K. *Oncologist*, **2011**, 13, 308–315.

¹² Richichi, B.; Thomas, B.; Fiore, M.; Bosco, R.; Qureshi, H.; Nativi, C.; Renaudet, O.; BenMohamed, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 11917–11920.

4. OBJETIVOS

De acuerdo con lo previamente expuesto, los objetivos principales de este trabajo comprenden:

- 1) La síntesis del antígeno Tn a partir de una ruta sintética ya descrita en la bibliografía,¹³ pero diferente a la empleada actualmente en el grupo de investigación. Asimismo, se evaluará para la preparación de dicho antígeno a escala de gramos.
- 2) La síntesis de los péptidos y glicopéptidos naturales APDTRP y APETRP mediante la metodología de síntesis en fase sólida asistida por microondas y su posterior purificación mediante HPLC semipreparativo.
- 3) Realización de un ensayo de unión entre dichos péptidos y el anticuerpo SM3 mediante *microarrays* que se realizará fuera de la Universidad de La Rioja gracias a una colaboración con el grupo del Prof. Nishimura (Universidad de Hokkaido, Japón).

¹³ Mingjing, L.; Fan, Y.; Chao, Y.; Peng, G.; Younghui, L.; Wei, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 993-999

5. ANTECEDENTES

Recientemente, el grupo de investigación de química biológica de la universidad de La Rioja ha descrito la estructura del antígeno Ala-Pro-Asp-Thr(α -O-GalNAc)-Arg-Pro con el anticuerpo anti-MUC1 mediante difracción de Rayos X¹⁴ (Figura 3). En esta estructura se puede apreciar que el residuo de prolina en el extremo N-terminal presenta un papel fundamental en la estabilización del complejo antígeno-anticuerpo. La estructura muestra que esta prolina está involucrada en interacciones CH/ π con diversos anillos aromáticos de residuos del anticuerpo. De igual forma, se puede observar que las cadenas laterales del ácido aspártico y de la arginina del antígeno también están involucradas en este tipo de interacciones.

Adicionalmente, dada la carga negativa de la cadena lateral del ácido aspártico de la secuencia APDTRP, se esperaría que este estuviera más expuesto y en contacto con el disolvente. En la estructura se puede observar que este residuo puede estar estabilizado mediante un enlace de hidrógeno entre el grupo carboxilato y el NH del de la arginina (Figura 3).

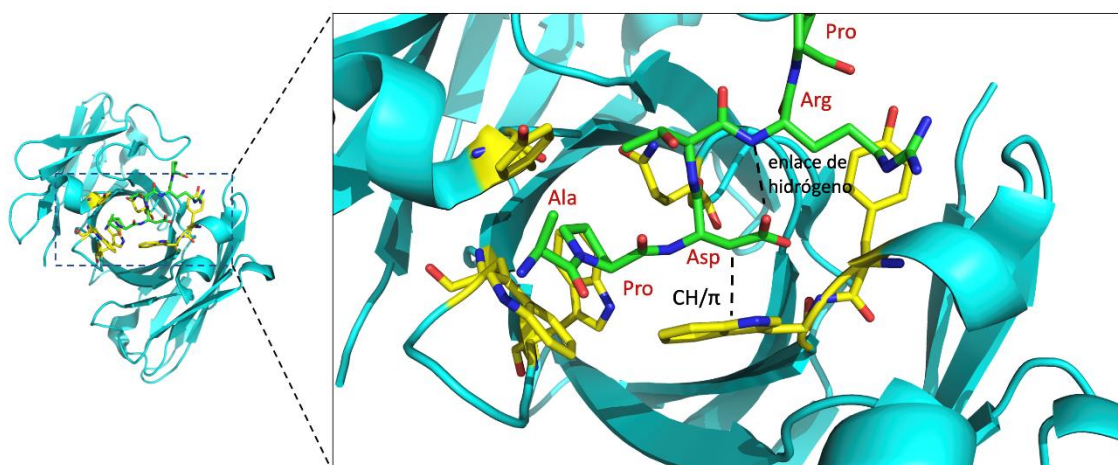


Figura 3. Estructura del antígeno Tn. Los carbonos del antígeno están representados en color verde y los carbonos de los residuos del anticuerpo que interaccionan directamente con el antígeno en amarillo.

Con estos estudios estructurales como base, el grupo de Investigación de Química Biológica (QuiBi) de la Universidad de La Rioja ha diseñado y sintetizado aminoácidos no naturales con éxito con el objetivo de aumentar la afinidad de dichos antígenos por los anticuerpos anti-MUC1 y su posible uso como biosensores. Como ejemplos, se han desarrollado miméticos del antígeno Tn basados en el aminoácido no natural α -metilserina¹⁵, S-glicosilaminoácidos en los que el carbono anomérico está unido al

¹⁴ N. Martínez-Sáez, J. Castro-López, J. Valero-González, D. Madariaga, I. Compañón, V. J. Somovilla, M. Salvadó, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, A. Avenzoza, J. M. Peregrina, F. Corzana et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 9830–9834.

¹⁵ Martínez-Sáez, N.; Supekar, N. T.; Wolfert, M. A.; Bermejo, I. A.; Hurtado Guerrero, R.; Asensio, J. L.; Jiménez-Barbero, J.; Busto, J. H.; Avenzoza, A.; Boons, G.-J.; Peregrina, J. M.; Corzana, F. *Chem. Sci.*, **2016**, 2294-2301.

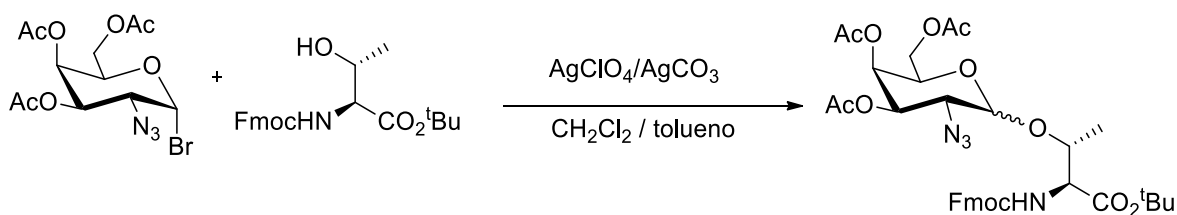
aminoácido mediante un átomo de azufre^{16,17} o aminoácidos fluorados derivados de la prolina, donde se han sustituido átomos de hidrógeno por flúor en posiciones específicas.¹⁸

A pesar de que el empleo de aminoácidos no naturales es una estrategia prometedora para la optimización de las interacciones antígeno-anticuerpo, y con ello su afinidad, el uso de aminoácidos naturales con los mismos fines presenta diversas ventajas. Así, los aminoácidos naturales presentan una mayor disponibilidad, asequibilidad económica y facilidad sintética. Debido a esto, uno de los objetivos de este trabajo será la modificación del residuo aspártico del antígeno de MUC1 por otro aminoácido natural, el ácido glutámico.

La metodología más empleada para la síntesis del antígeno Tn, que es a su vez usada en el grupo de investigación, es la síntesis tipo Koenigs-Knorr. Sin embargo, en la bibliografía hay descritas otras rutas sintéticas que se pueden realizar a gran escala, como pueden ser el método de Schmidt y la síntesis con tricloroacetimidatos como donadores de glicosilo, siendo esta última la empleada en la realización de este trabajo.

- METODOLOGÍA DE KOENIGS-KNORR.

El método de Koenigs-Knorr es uno de los procedimientos más antiguos empleados para la reacción de glicosilación y a pesar de ello sigue siendo uno de los más usados. Dicho método utiliza un donador de glicosilo que es un haluro de glicosilo y cuya activación se realiza con sales de plata.^{19,20} En estas condiciones se obtiene mayoritariamente el anómero α (Esquema 1).



Esquema 1. Método Koenigs- Knorr

¹⁶ Aydillo, C.; Compañón, I.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Corzana, F.; Peregrina, J. M.; Zurbano, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 789–800.

¹⁷ Compañón, I.; Guerreiro, A.; Mangini, V.; Catro-López, J.; Escudero-Casao, M.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Castellón, S.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L.; Jiménez-Osés, G.; Boutureira, O.; Peregrina, J. M.; Hurtado-Guerrero, R.; Fiammengo, R.; Bernardes, G. J. L.; Corzana, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4063-4072

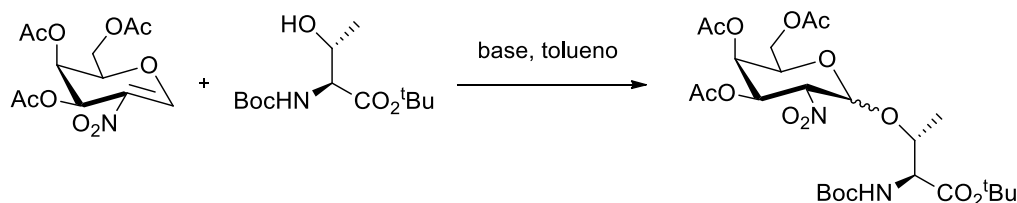
¹⁸ Somovilla, V. J.; Bermejo, I. A.; Albuquerque, I. S.; Martínez-Sáez, N.; Castro-López, J.; Garcia-Martin, F.; Compañón, I.; Hinou, H.; Nishimura, S.-I.; Jiménez-Barbero, J.; et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18255–18261

¹⁹ Koenigs, W.; Knorr, E. *Chem. Ver.* **1901**, *34*, 957-981

²⁰ Liebe, B.; Kunz, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 618-621

- METODOLOGÍA SCHMIDT.

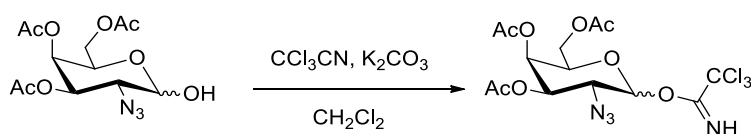
La ruta de Schmidt está basada en una adición de tipo Michael.^{21,22} Esta metodología permite obtener de forma selectiva un anómero mayoritariamente frente al otro dependiendo de la base que se use en la reacción. El uso bases fuertes genera de forma mayoritaria el anómero α , mientras que el uso de bases más débiles permite obtener mayoritariamente el anómero β (Esquema 2).



Esquema 2. Método Schmidt.

- METODOLOGÍA DEL TRICLOROACETIMIDATO.

En esta metodología se requiere la síntesis de un tricloroacetimidato como donador de glicosilo (Esquema 3) para la reacción de *O*-glicosilación y cuya activación se realiza mediante ácidos de Lewis. Las rutas descritas en la literatura reportan una mayor obtención del anómero α frente al β , de forma similar a la metodología Koenigs-Knorr, aunque con mejores ratios α/β . Esto se debe, en parte, al efecto anomérico y al uso de dietil éter como co-solvente en la reacción de glicosilación²³ (Esquema 4).

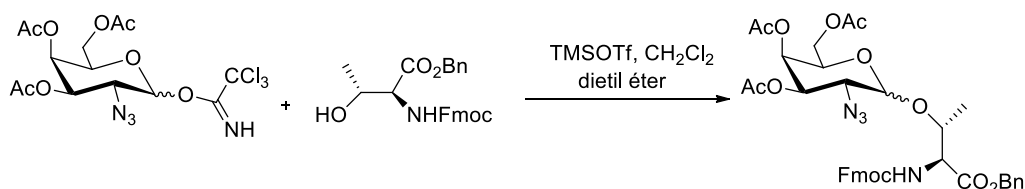


Esquema 3. Síntesis del tricloroacetimidato

²¹ Das, J.; Schmidt, R. R. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1609-1613

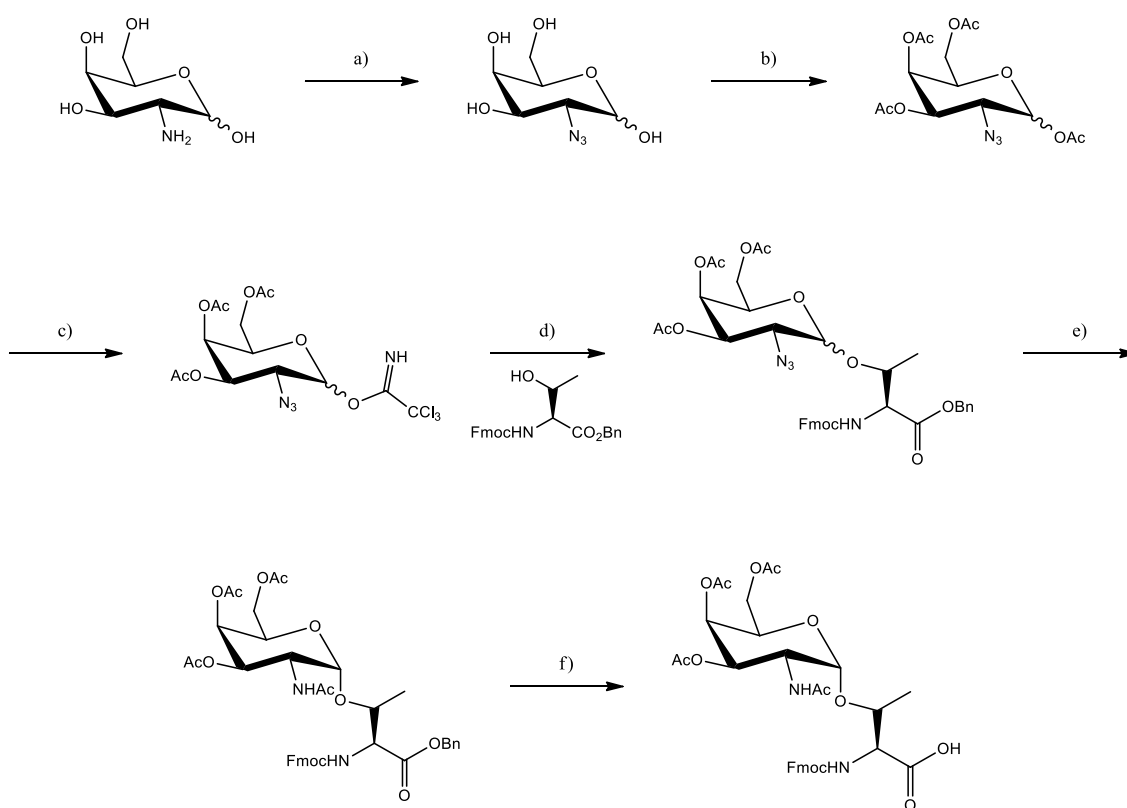
²² Kogan, T. P.; Gaeta, F. C. A. *Synthesis* **1988**, 706-707.

²³ Payne, R. C.; Ficht S.; Brick, A.; Yang, Y.-Y.; Case, D.A.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13527-13536



Esquema 4. Síntesis del antígeno Tn mediante el método del tricloroacetimidato

En este trabajo se ha realizado la síntesis del antígeno Tn convenientemente protegido para realizar síntesis peptídica en fase sólida mediante la metodología del tricloroacetimidato que se muestra en el esquema 5, con diversas modificaciones que serán explicadas en el siguiente apartado.²⁴



Reactivos: (a) Azida de 1-sulfonil imidazol, Cu_2SO_4 , K_2CO_3 , MeOH; (b) Ac_2O , piridina; (c) DMAPA, THF/DCM; después CCl_3CN , DBU, CH_2Cl_2 ; (d) TMSOTf, CH_2Cl_2 ; (e) AcSH , pyridine; (f) Pd/C, H_2 , EtOAc.

Esquema 5. Ruta sintética del antígeno Tn convenientemente protegido para realizar síntesis en fase sólida.

²⁴ Mingjing, L.; Fan, Y.; Chao, Y.; Peng, G.; Younghui, L.; Wei, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 993-999

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

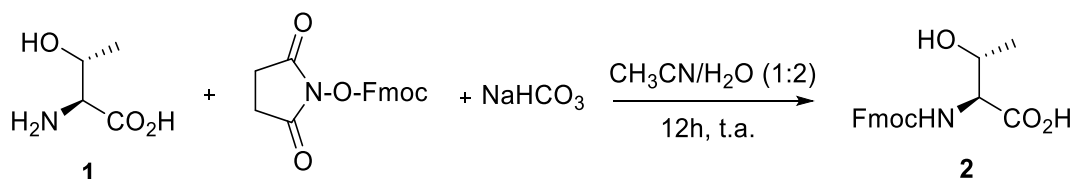
1. SÍNTESIS DE Tn

Para la síntesis del antígeno Tn se llevaron a cabo, en primer lugar, la preparación tanto del aminoácido como del carbohidrato convenientemente protegidos. Después, se procedió a realizar la reacción de glicosilación y desprotección posteriores, como se explicará más adelante, para obtener el antígeno preparado para su utilización en síntesis en fase sólida de péptidos.

PREPARACIÓN DEL AMINOÁCIDO NATURAL.

En primer lugar, se realizó la protección de los grupos amino y ácido del aminoácido natural L-treonina. La elección de los grupos protectores se realizó siguiendo dos criterios principales. En primer lugar, que fueran adecuados para su uso en síntesis de péptidos en fase sólida y, en segundo lugar, que ambos grupos fueran ortogonales, de manera que se pudieran eliminar de forma selectiva en la última etapa de desprotección de la síntesis.

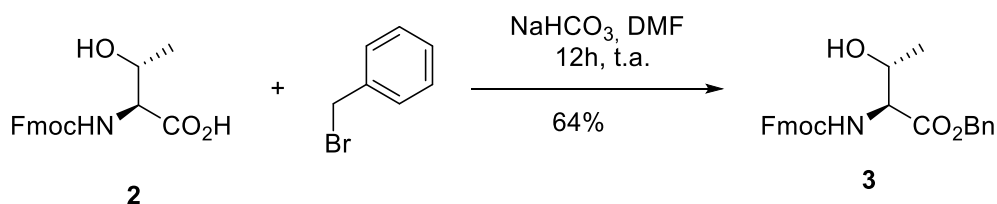
Así, partiendo de L-treonina (**1**) se protegió el grupo amino, con Fmoc en medio básico (Esquema 6).



Esquema 6. Protección del grupo amino de la L-treonina con Fmoc.

Las aminas son comúnmente protegidas en forma de carbamatos, usándose en este caso un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Este grupo protector es resistente al medio ácido, empleado en la etapa de glicosilación posterior, y va a ser el grupo protector empleado para el uso del glicoaminoácido en la síntesis peptídica en fase sólida.

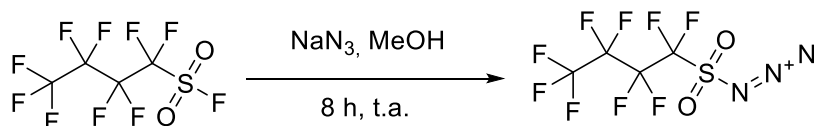
Con el grupo amino protegido, se procedió a la protección del grupo carboxílico. Para ello se empleó bromuro de bencilo en medio básico bajo atmósfera inerte. Esto permitió la obtención del derivado de L-treonina **3** convenientemente protegido para ser utilizado en la etapa de glicosilación posterior (Esquema 7).



Esquema 7. Protección del grupo ácido con Bn en el compuesto **2**.

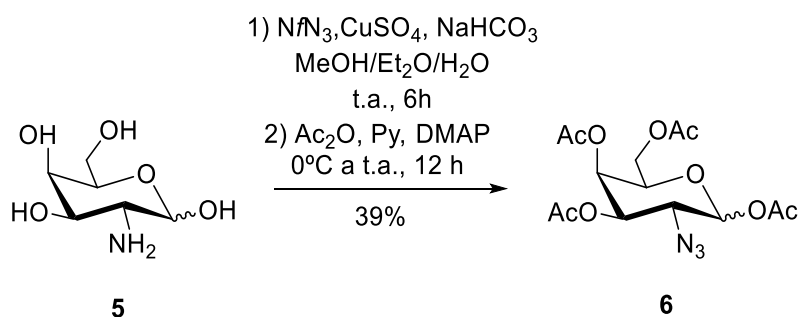
PREPARACIÓN DEL CARBOHIDRATO

La síntesis del donador de glicosilo se realizó a partir D-galactosamina. Para ello, en primer lugar, se realizó una reacción de diazotransferencia con el objetivo de proteger la función amino. Entre los reactivos más usados en estas reacciones podemos encontrar la azida de trifluorometanosulfonilo o trifil azida (TfN_3). A pesar de las condiciones suaves de reacción y la gran compatibilidad de grupos protectores de este reactivo, también presenta ciertos inconvenientes. Entre ellos, su alta inestabilidad y su carácter explosivo. Por ello, se procedió a buscar un reactivo que fuera más seguro y estable. En su lugar se empleó la azida de nonafluorosulfonilbutano (NfN_3), previamente descrita en la literatura en reacciones de diazotransferencia en carbohidratos, ya que, gracias a su alto peso molecular, este compuesto no presenta las propiedades explosivas que pueden mostrar otros compuestos derivados de azidas. Este derivado se sintetizó mediante un procedimiento descrito en la bibliografía, tal y como se muestra en el esquema 8 y se empleó para la síntesis del compuesto **5**,^{25,26} siguiendo las condiciones que se muestran en el Esquema 9.



Esquema 8. Formación de NfN_3 .

A continuación, se procedió a peracetilar los grupos hidroxilo del carbohidrato mediante el uso de anhídrido acético en piridina. Cabe destacar que la adición del anhídrido acético se realizó a 0°C debido al carácter exotérmico de la reacción (Esquema 9).

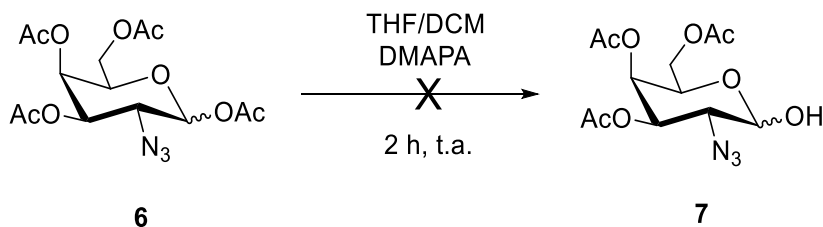


Esquema 9. Preparación del derivado **6** a partir de D-galactosamina.

²⁵ Shi-Zheng, Z. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1.* **1994**, 2077-2071

²⁶ Suarez, J-R.; Trastoy, B.; Perez-Ojeda, M-E.; Marín-Barrios, R.; Chiara, J-L. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 2515-2520

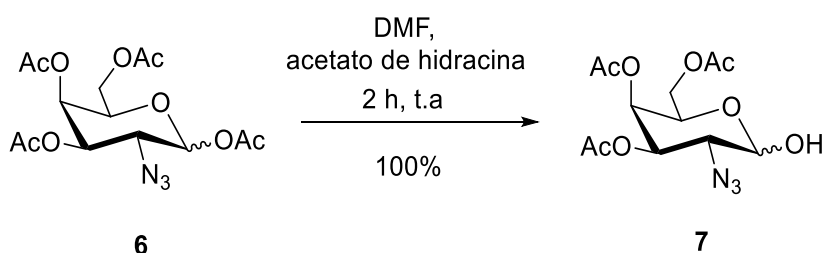
A continuación, se llevó a cabo la desacetilación del carbono anomérico de forma selectiva siguiendo el procedimiento ya descrito²⁷ (Esquema 10). Así, se llevó a cabo la reacción con (dimetilamino)propilamina (DMAPA). Sin embargo, no se pudo aislar el derivado deseado **7**, sino que se obtuvo una mezcla de productos de degradación.



Esquema 10. Desacetilación selectiva del carbono anomérico en el compuesto **6**.

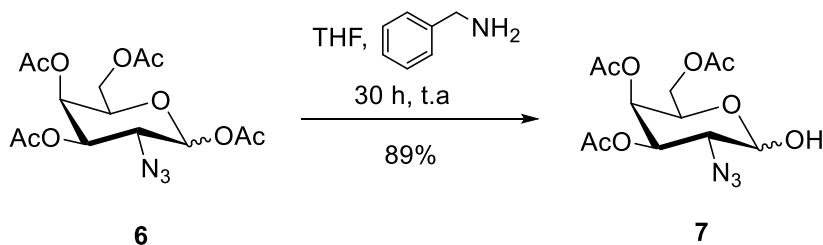
Debido a esto, se procedió a buscar métodos alternativos para realizar la desprotección de la función anomérica. Para ello se exploraron dos métodos distintos, ampliamente empleados en síntesis de carbohidratos:

- a) Tratamiento del compuesto **6** con acetato de hidracina. Esta estrategia nos permitió obtener el derivado **7** con éxito (Esquema 11).



Esquema 11. Desacetilación selectiva del carbono anomérico en el derivado **6** mediante el método a.

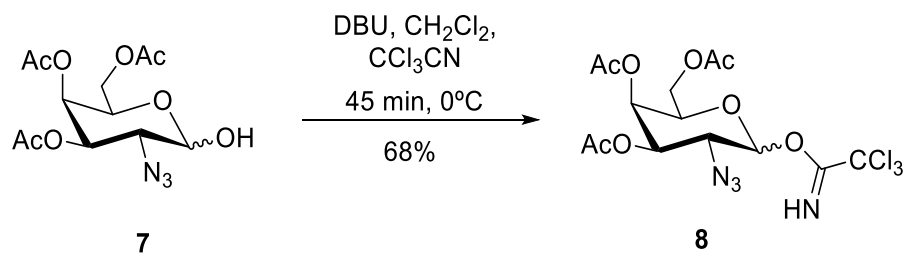
- b) Tratamiento del compuesto **6** con bencilamina. A pesar de requerir un mayor tiempo de reacción, también se consiguió el compuesto **7** con éxito (Esquema 12).



Esquema 12. Desacetilación selectiva del carbono anomérico del derivado **6** mediante el método b.

²⁷ Mingjing, L.; Fan, Y.; Chao, Y.; Peng, G.; Younghui, L.; Wei, Z. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 993-999.

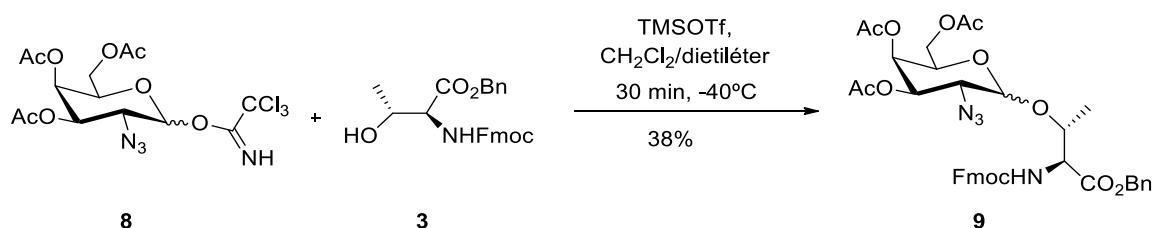
Una vez se obtuvo el compuesto **7**, se procede a formar el tricloroacetimidato, mediante el uso de CCl_3CN y DBU en las condiciones que aparecen en el Esquema 13, obteniéndose así el donador de glicosilo **8** convenientemente protegido para poder realizar el acoplamiento con el aminoácido.



Esquema 13. Formación del tricloroacetimidato **8**.

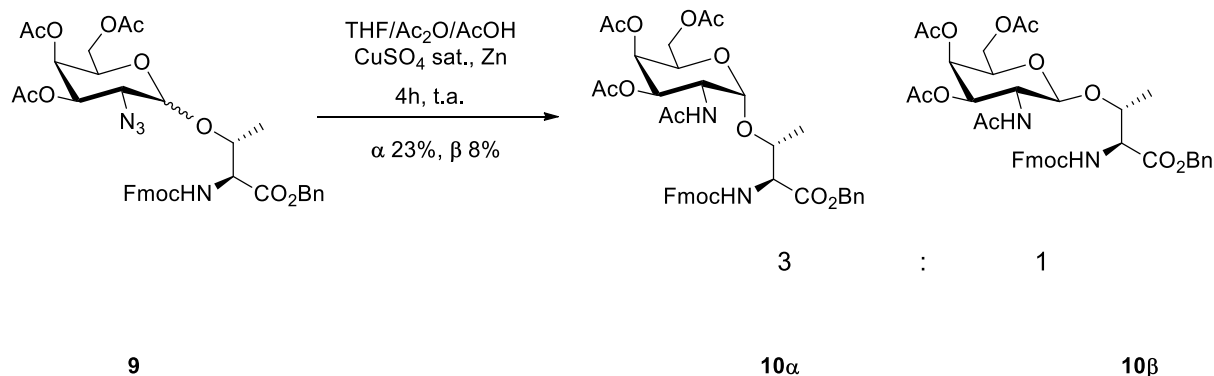
FORMACIÓN DEL ENLACE GLICOSÍDICO.

Partiendo de los compuestos **3** y **8**, se realizó la correspondiente reacción de glicosilación. Para ello, se disolvieron ambos compuestos en una mezcla de CH₂Cl₂ y dietil éter anhidros. El CH₂Cl₂ se usó para facilitar la solubilidad de todos los compuestos en la mezcla de reacción y el dietil éter se usó como co-disolvente debido a sus efectos en la estereoquímica de la reacción, ya que favorece la formación del anómero α. Tras enfriar la mezcla de reacción a -40 °C se añadió TMSOTf y se obtuvo el compuesto **9** glicosilado como una mezcla de los anómeros α/β donde α era el producto mayoritario (Esquema 14).



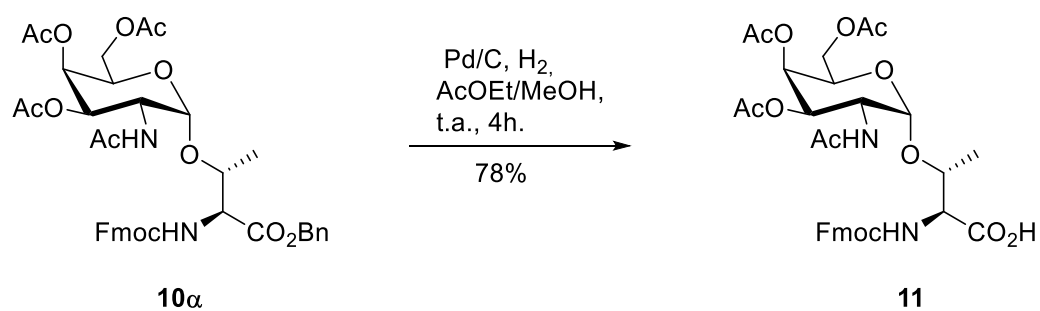
Esquema 14. Reacción de glicosilación entre los compuestos **3** y **8**.

Una vez realizada la glicosilación, se procedió a la conversión del grupo azido en acetamida. Para ello, sobre una disolución del compuesto **9** en THF/AcOH/Ac₂O, se añadió Zn y una disolución de CuSO₄ saturada (Esquema 15). Mediante esta reacción no solo se consigue el producto deseado **10**, sino que también se consigue separar los anómeros α y β mediante cromatografía *flash* en columna quedándonos únicamente con el derivado **10α**.



Esquema 15. Transformación del grupo azido a acetamido.

Como último paso se procedió a la desprotección del grupo carboxílico del aminoácido para obtener el compuesto final **11** mediante una reacción de hidrogenación (Esquema 16).



Esquema 16. Desprotección del grupo carboxílico en el derivado **10 α** .

2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MEDIANTE SPPS

Como siguiente etapa del proyecto se realizó la síntesis de los péptidos APDTRP y APETRP en fase sólida asistida por microondas (MW-SPPS).

La síntesis de los péptidos mediante el método MW-SPPS y metodología Fmoc se realiza en dirección C- a N-terminal y para el acoplamiento de cada aminoácido se repite el siguiente proceso:

- Desprotección del grupo amino del aminoácido presente en la resina o de la resina.
- Secuencia de lavados.
- Acoplamiento a la resina o al aminoácido previamente acoplado.
- Secuencia de lavados.
- Desprotección final del grupo amino del residuo en la posición N-terminal.

Una vez finalizada la síntesis de la secuencia peptídica se procede a desanclar el péptido de la resina y a la desprotección de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos presentes en la secuencia. Todo ello se consigue tratando la resina con una mezcla de TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5). Finalmente, los péptidos son precipitados en éter frío, purificados mediante HPLC semipreparativo, liofilizados y caracterizados.

La resina elegida a la hora de realizar el proceso de síntesis tiene gran relevancia, no solo a la hora de iniciar la síntesis, también en el proceso de desanclaje, en el cual el péptido sintetizado se libera de la resina. En este caso la resina utilizada es Rink Amide MBHA (Figura 4), que en el proceso de desanclaje libera el extremo C-terminal del péptido en forma de grupo amida (-CONH₂), imitando así una secuencia peptídica.

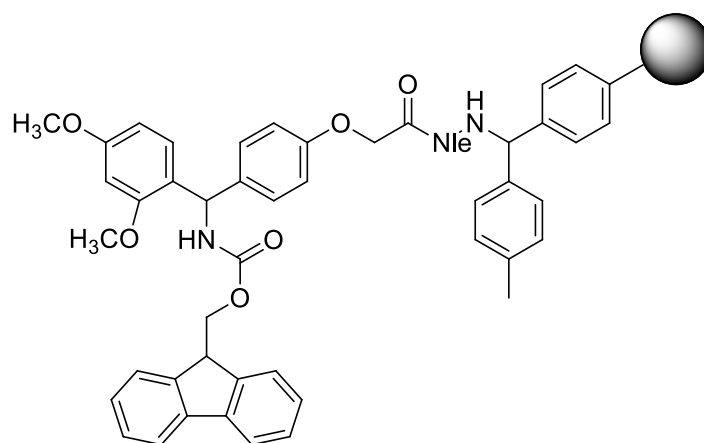


Figura 4. Resina Rink amide MBHA.

Actualmente se está llevando a cabo la síntesis de los glicopéptidos derivados de la MUC1 con el antígeno Tn mediante el mismo procedimiento.

3. ANALISIS MICROARRAY

La afinidad de los péptidos sintetizados por el anticuerpo anti-MUC1 SM3 se estudió mediante una técnica de *microarray* mediante una colaboración con el grupo del Prof. Nishimura (Universidad de Hokkaido, Japón).

En esta técnica, el péptido sintetizado se ancla a la superficie de un *microchip* mediante su extremo *N*-terminal de forma covalente ya que la superficie del chip presenta ésteres activados con *N*-hidroxisuccinimida. Tras una secuencia de lavados para eliminar el exceso de péptido no unido, las posiciones que no han reaccionado se bloquean con etanolamina. A continuación, se realiza una incubación con el anticuerpo comercial SM3. Finalmente, y tras realizar otra secuencia de lavados, el *microchip* se incuba con un anticuerpo secundario capaz de reconocer la fracción Fc del anticuerpo SM3 y que está conjugado a una molécula fluorescente (en nuestro caso Cy3). El exceso de dicho anticuerpo también es eliminado mediante una secuencia de lavados. Como último paso, se lleva a cabo la medida de fluorescencia, de la cual se puede derivar el grado de unión entre el péptido y el anticuerpo SM3.

Los resultados preliminares obtenidos se muestran en la gráfica 1. Se puede observar que el derivado APETRP presenta una afinidad ligeramente inferior a la del antígeno natural.

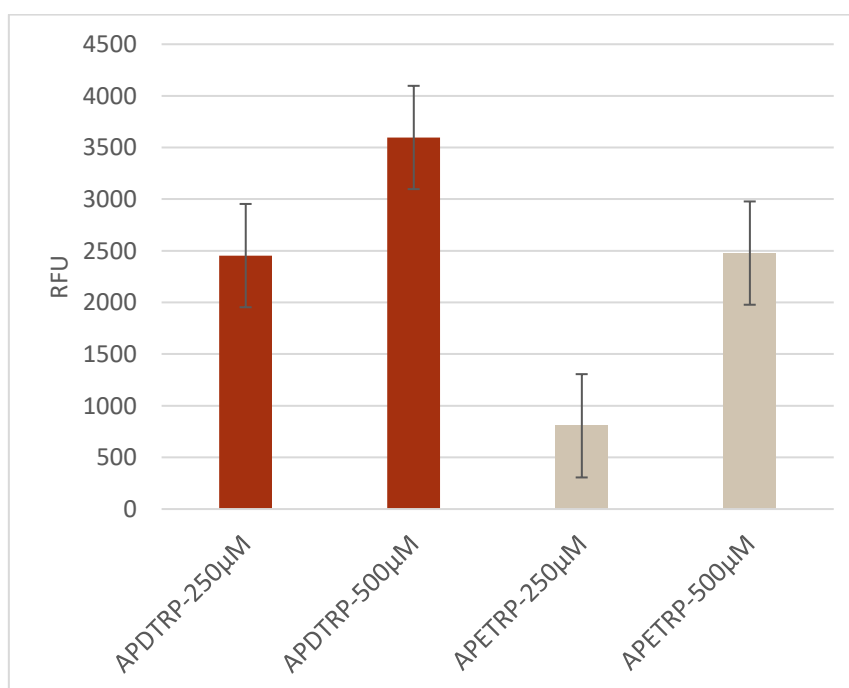


Gráfico 1. Afinidades de los péptidos con el anticuerpo comercial anti-MUC1 SM3.

Con el fin de explicar estos resultados, se partió de la estructura de rayos X anteriormente comentada y se sustituyó el ácido aspártico por un glutámico utilizando el programa Pymol (<https://pymol.org/2/>). A continuación, se realizó una minimización

por mecánica molecular utilizando el programa AMBER 18 (<http://ambermd.org>), implementado con el campo de fuerzas ff14SB.²⁸

Como puede verse en la Figura 5, el derivado con ácido glutámico mimetiza las dos interacciones anteriormente descritas (CH/ π y enlace de hidrógeno). Esta estructura podría explicar la afinidad presentada por el derivado APETRP.

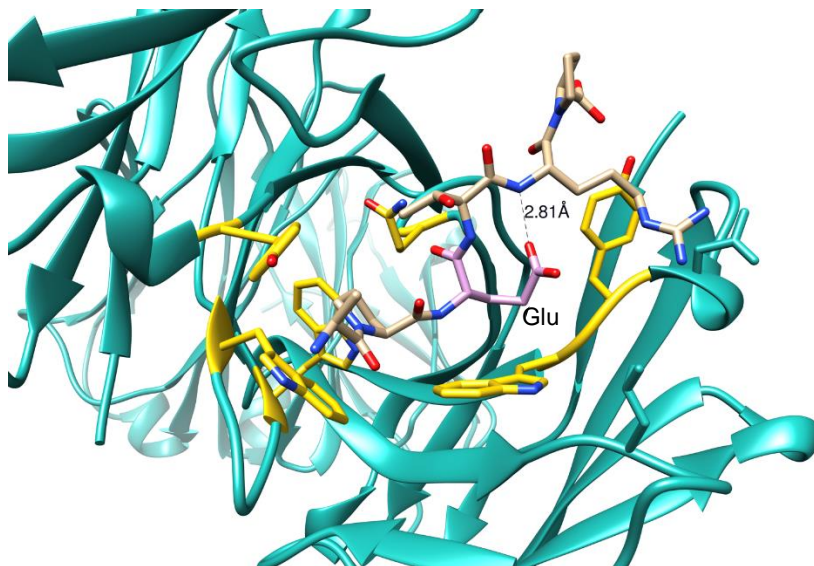


Figura 5. Estructura minimizada (campo de fuerzas ff14SB) para el complejo del SM3 con el péptido APETRP. Los carbonos del antígeno están representados en color marrón y los carbonos de los residuos del anticuerpo que interaccionan directamente con el antígeno en amarillo. El residuo de ácido glutámico aparece en color violeta.

Lógicamente, el cambio de un residuo por otro puede tener también repercusiones importantes en las preferencias conformacionales de los péptidos en disolución y, por tanto, también en la unión de los péptidos. En los próximos meses y fuera ya del ámbito de este trabajo, se llevarán a cabo los estudios conformacionales mediante RMN y cálculos de dinámica (DM) molecular. Así mismo, se realizarán DM del complejo con el péptido sintetizado en esta memoria.

²⁸ Maier, J.A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K.E.; Simmerling, C. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696-3713

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis del antígeno Tn, convenientemente protegido para la síntesis en fase sólida, con éxito mediante una ruta diferente a la utilizada en el grupo de investigación. Además, ha permitido analizar y comparar esta ruta con la de Koenigs-Knorr, llegando a la conclusión de que a pesar de que la metodología de esta última es mucho más antigua sigue presentando algunas ventajas. En concreto, a pesar de la mejor selectividad hacia el anómero α presentada por la ruta del tricloroacetimidato, la mayor facilidad para la preparación del donador de glicosilo mediante la ruta de Koenigs-Knorr hacen que esta ruta siga siendo la más atractiva para la síntesis del antígeno Tn.

También se ha llevado a cabo de manera satisfactoria la síntesis del péptido derivado de la MUC1 (APETRP) y el análisis de la unión de dicho derivado con el anticuerpo SM3 mediante un ensayo por *microarray*.

Como se ha podido observar en los resultados obtenidos, el cambio de ácido aspártico por glutámico no conduce a grandes modificaciones en la capacidad de unión de este péptido al anticuerpo. De acuerdo con las estructuras minimizadas por mecánica molecular, este derivado con ácido glutámico conserva tanto la interacción CH/ π como el enlace de hidrógeno intramolecular observado en el epítipo natural.

Por tanto, se ha conseguido un epítipo diferente al natural que tiene afinidad por un anticuerpo anti-MUC1 y que podrá utilizarse como biosensor para la detección precoz del cáncer. También será interesante comprobar sus propiedades inmunogénicas mediante la preparación, y posterior ensayo en ratones, de una vacuna contra el cáncer que contenga la secuencia APETRP.

8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Procedimientos generales

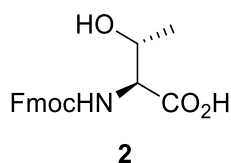
Las reacciones realizadas a lo largo de este proyecto han sido seguidas mediante cromatografía de capa fina (TLC), para ello se utilizaron placas de silica gel sobre soporte de poliéster. Para su visualización se utilizó luz ultravioleta y disoluciones reveladoras tanto de ácido fosfomolibdico en etanol como H_2SO_4 al 5% en etanol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear tanto de ^1H como de ^{13}C se realizaron en un equipo Bruker-ARX-300 y Bruker Avance-400, usando como disolvente CDCl_3 o D_2O . Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

Para realizar los análisis de electrospray-espectrometría de masas se utilizó un equipo mircrOTOF-Q-BRUKER con fuente *MultiMode*, ionización ESI+APCI y se registraron con ión positivo.

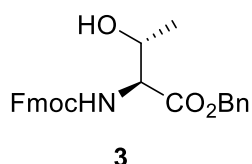
La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) se realizó en un sintetizador automático Liberty Blue asistido por microondas.

Síntesis del compuesto 2



Sobre una disolución de L-treonina (5 g, 42.0 mmol), en una mezcla de acetonitrilo/agua 2:1 (225 mL) se añadieron NaHCO₃ (10.579 g, 125.9 mmol) y Fmoc-O-Suc (20.8 g, 62.9 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente una noche. A continuación, la mezcla de reacción se lavó tres veces con AcOEt. La fase acuosa fue acidificada con una disolución de HCl 2 M hasta pH = 2, tras lo cual se extrajo 3 veces con una mezcla de CHCl₃/*i*Pr (3:1). Esta fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrada y se evaporó el disolvente a sequedad. Este producto fue usado en la siguiente etapa sintética sin purificación adicional.

Síntesis del compuesto 3

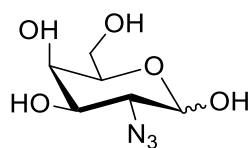


Sobre una disolución del crudo del compuesto **2** en DMF anhidra (60 mL) bajo atmósfera inerte se añadió NaHCO₃ (10.6 g, 125.9 mmol) y bromuro de bencilo (7.5 mL, 62.9 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después, el disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo de reacción se disolvió en diclorometano y se extrajo con agua. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrada y se evaporó el disolvente a sequedad. Finalmente, el producto fue purificado mediante cromatografía *flash* en columna (hexano/AcOEt 7:3) para obtener el compuesto **3** como un aceite incoloro (11.6 g, 27 mmol, 65%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.44 – 7.27 (m, 9H), 5.56 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 5.27 – 5.16 (m, 2H), 4.48 – 4.32 (m, 5H), 4.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.24 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H).

HRMS (ESI⁺): calculada para C₂₆H₂₆NO₅ [M+H⁺]: 432.1811, encontrada: 432.1954.

Síntesis del compuesto 5

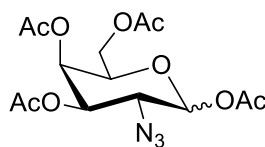


5

Sobre una disolución de perflurosulfonilbutano (10.5 g, 34.8 mmol) en MeOH (70 mL) se añadió azida de sodio (2.3 g, 34.8 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. A continuación, se añadió Et₂O (70 mL) y se realizó una extracción con H₂O a 0 °C. La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y fue usada como disolución en la siguiente reacción.

Sobre una disolución de D-galactosamina (5.0 g, 23.2 mmol) en H₂O (50 mL) y MeOH (130 mL) se añadió la disolución de azida de perfluorobutananosulfonilo recién preparada. A continuación, se añadió CuSO₄·5H₂O (0.87 g, 3.5 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, tras lo cual el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto fue usado en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Síntesis del compuesto 6

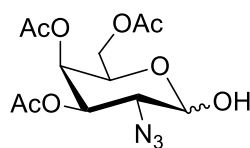


6

Sobre una disolución del compuesto 5 (4.8 g, 23.2 mmol) en piridina (40 mL) bajo atmósfera inerte a 0°C se añadió Ac₂O (15 mL) durante 5 minutos y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (0.2 eqv.). La mezcla de reacción se agitó durante una noche, parándose la reacción mediante la adición MeOH a 0°C. Tras evaporar el disolvente a presión reducida, el crudo de reacción se disolvió en AcOEt, se lavó dos veces con una disolución HCl 0.5M, una disolución NaHCO₃ saturado y NaCl saturado. Después se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía *flash* en columna (AcOEt/Hexano 3:7) para obtener el producto 6 un aceite incoloro (3.4 g, 8.9 mmol, 39%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.32 (d, *J* = 3.6 Hz, 0.2 H), 5.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.48 (dd, *J* = 3.3, 1.4 Hz, 0.2 H), 5.38 (dd, *J* = 3.4, 1.2 Hz, 1H), 5.32 (dd, *J* = 11.0, 3.3 Hz, 0.2 H), 4.89 (dd, *J* = 10.8, 3.3 Hz, 1H), 4.28 (t, *J* = 6.6 Hz, 0.2 H), 4.18 – 4.05 (m, 2.4 H), 4.00 (td, *J* = 6.7, 1.2 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 11.0, 3.6 Hz, 0.2 H), 3.84 (dd, *J* = 10.8, 8.5 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.17 (m, 7 H) 2.07 (s, 0.8H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).

Síntesis del compuesto 7



7

Método A:

Sobre una disolución del compuesto **6** (1.0 g, 2.7 mmol) en THF/DCM 1:1 (10mL) se añadió DMAPA (1.7 mL) y se agitó a temperatura ambiente 2 horas. Tras esto, se lavó con NH₄Cl saturado y NaCl saturado, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a sequedad.

Método B:

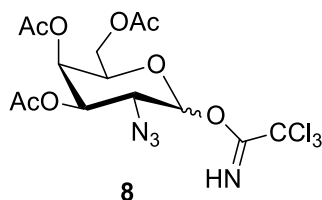
Sobre una disolución del compuesto **6** (0.5 g, 1.3 mmol,) en DMF (2.78 mL) se añadió acetato de hidracina (1.2 g, 1.3 mmol). La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente a presión reducida, se obtuvo producto **7** (0.43 g, 1.3 mmol, 100%) tras purificación mediante cromatografía *flash* en columna (Hexano/AcOEt 8:2).

Método C:

Sobre una disolución del compuesto **6** en THF (6.5 mL) se añadió bencilamina (0.16 mL, 1.4 mmol). La reacción se agitó durante 30 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados con HCl 0.5 M y con NaCl saturado, la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, filtrada y se evaporó el disolvente a sequedad. Por último, se purificó el crudo obtenido mediante una columna cromatográfica *flash* (hexano/AcOEt 7:3) obteniendo el compuesto **7** (0.38 g, 1.2 mmol, 89%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.43 (m, 3H), 5.35 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.82 (dd, *J* = 10.8, 3.3 Hz, 1H), 4.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.17 – 4.04 (m, 4H), 3.91 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.75 (dd, *J* = 11.0, 3.5 Hz, 1H), 3.67 (dd, *J* = 10.9, 7.9 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.06 (s, 6H), 2.05 (s, 6H).

Síntesis del compuesto 8

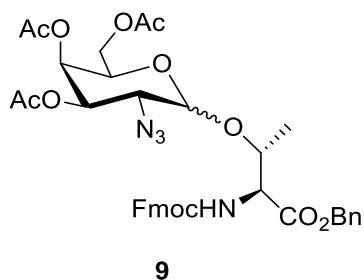


8

Sobre una disolución del compuesto **7** (0.38 g, 1.2 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (6 mL) bajo atmósfera inerte a 0 °C, se añadieron de CCl₃CN (1.2 mL, 11.6 mmol) y DBU (0.1 mL, 0.9

mmol). Se agitó durante 45 minutos a 0°C y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante una columna cromatográfica *flash* (hexano/AcOEt 8:2, luego 7:3) para obtener el compuesto **8** en forma de un aceite incoloro (0.37 g, 0.8 mmol, 67%).

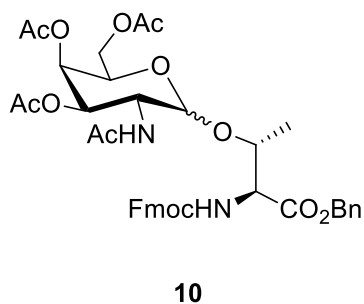
Síntesis del compuesto 9



Sobre una disolución del compuesto **3** (0.40 g, 0.9 mmol) y del compuesto **8** (0.37 g, 0.8 mmol), previamente secados mediante co-evaporación con tolueno, en CH₂Cl₂ anhidro (8 mL) y Et₂O anhidro (8 mL) a -40°C se añadió TMSOTf (0.03 mL, 0.2 mmol). Después de 30 minutos, la reacción fue parada mediante la adición de trietilamina (0.1 mL) y el disolvente se evaporó a sequedad. Finalmente, el crudo obtenido se purificó mediante cromatografía *flash* en columna con gradiente de concentración del eluyente hexano/AcOEt (9:1 hasta 6:4), para obtener el compuesto **9** como mezcla de anómeros (**9** como mezcla de anómeros (0.49 g, 0.7 mmol, 38%) y con el exceso de compuesto **3** como impureza.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) señales significativas: 5.69 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH anómero α), 4.92 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H1α), 4.68 (dd, *J* = 10.9, 3.5 Hz, 0.4 H, H3β), 3.61 (dd, *J* = 11.2, 3.6 Hz, 1H, H2α) 1.40 – 1.34 (m, 4.4H, -CH₃ Thr).

Síntesis del compuesto 10

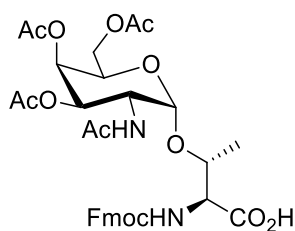


Sobre una disolución del compuesto **9** (0.49 g, 0.7 mmol) en una mezcla de THF/Ac₂O/AcOH 3:1:2 (9.87 mL), fueron añadidos Zn (0.56 g, 8.6 mmol) y una disolución saturada de CuSO₄ (1 mL). La reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se filtró sobre diatomeas y se diluyó con AcOEt. A continuación, se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. Finalmente, el crudo obtenido se purificó

mediante una columna cromatográfica *flash* con gradiente (hexano/AcOEt 6:4 hasta 3:7) para obtener los productos **10α** (0.11 g, 0.2 mmol, 23%) y **10β** (0.04 g, 0.05 mmol, 8%) como aceites incoloros.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , **10α**) δ 7.81 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.49 – 7.30 (m, 9H), 5.84 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 5.68 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 5.44 – 5.37 (m, 1H), 5.27 – 5.03 (m, 3H), 4.82 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.60 – 4.42 (m, 4H), 4.33 – 4.03 (m, 5H), 2.19 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.33 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

Síntesis del compuesto 11



11

Sobre una disolución del compuesto **10α** (0.11 g, 0.2 mmol) en una mezcla de AcOEt/MeOH 2:1 (30 mL), se añadió Pd/C (0.01 g, 10%) y la mezcla se agitó bajo atmósfera de H_2 durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo se filtró sobre diatomeas y se evaporó el disolvente bajo presión reducida. El producto obtenido se disolvió en AcOEt y se extrajo dos veces con una disolución saturada de NaHCO_3 . Las fases acuosas combinadas se acidificaron con HCl 2M hasta pH=2 y se extrajeron 3 veces con una mezcla de CHCl_3 / i Pr (3:1). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida (0.10 g, 0.15 mmol, 78%). El compuesto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

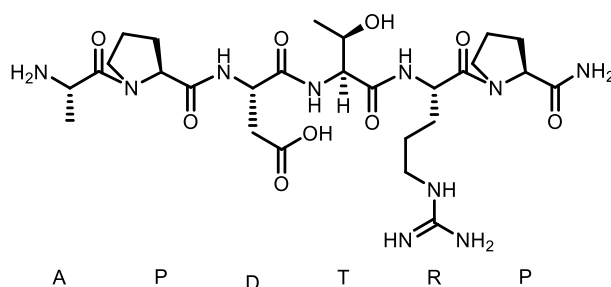
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) señales significativas δ 6.07 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 5.94 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 5.03 (d, J = 3.8 Hz, 1H, H1), 1.28 (d, J = 6.2 Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA SPPS.

Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida asistida por microondas (MW-SPPS) en un sintetizador Liberty Blue. Como resina se utilizó MBHA Rink Amide (0.1 mmol) y como agentes de acoplamiento OxymaPure/DIC.

Los péptidos sintetizados se liberaron de la resina a la vez que se eliminaban los grupos protectores, lábiles en medio ácido, utilizando 4 mL de una mezcla de TFA / TIS / H₂O (95: 2.5: 2.5). La resina se agitó a temperatura durante 1 hora. Pasado este tiempo, los péptidos fueron precipitados con 10 mL de dietiléter frío y centrifugados durante 5 minutos a 20000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y este proceso se repitió 3 veces. Los péptidos se secaron y se re-disolvieron en agua para poder purificarlos mediante HPLC de fase inversa, usando una columna Phenomenex Luna C18 21.20x250 mm con un flujo de 10 mL/min. La detección UV se realizó a 212 nm.

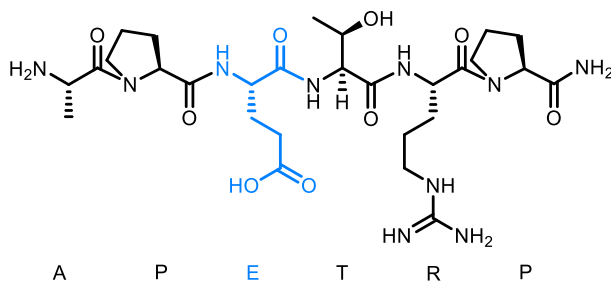
APDTRP:



Para la purificación del péptido APDTRP se utilizó un gradiente H₂O + 0.1% TFA / ACN 98:2 a 85:15 durante 40 minutos. El tiempo de retención fue de 15.7 minutos.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.65-4.63 (m, 1H), 4.55 (dd, J = 8.3, 5.2 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 8.3, 6.2 Hz, 1H), 4.30 – 4.24 (m, 2H), 4.20 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.13 – 4.03 (m, 1H), 3.76 – 3.65 (m, 1H), 3.64 – 3.56 (m, 1H), 3.57 – 3.48 (m, 2H), 3.10 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.87 (dd, J = 17.0, 6.6 Hz, 1H), 2.79 (dd, J = 17.0, 7.0 Hz, 1H), 2.21 (tdt, J = 13.0, 8.4, 6.5 Hz, 2H), 2.00 – 1.51 (m, 10H), 1.42 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.07 (d, J = 6.8, 3H).

APETRP:



Para la purificación del péptido APETRP se utilizó un gradiente H₂O + 0.1% TFA / ACN 88:12 a 85:15 durante 15 minutos. El tiempo de retención fue de 8.9 minutos.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.56 (dd, J = 8.2, 5.2 Hz, 1H), 4.38 (dd, J = 8.3, 6.3 Hz, 1H), 4.34 – 4.23 (m, 3H), 4.20 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 4.07 – 3.97 (m, 1H), 3.76 – 3.65 (m, 1H), 3.64 –

3.55 (m, 1H), 3.56 – 3.45 (m, 2H), 3.10 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.21 (dtd, J = 15.2, 12.5, 6.9 Hz, 2H), 2.05 – 1.50 (m, 12H), 1.41 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.07 (t, J = 5.6 Hz, 3H).

9. ANEXO. ESPECTROS DE RMN



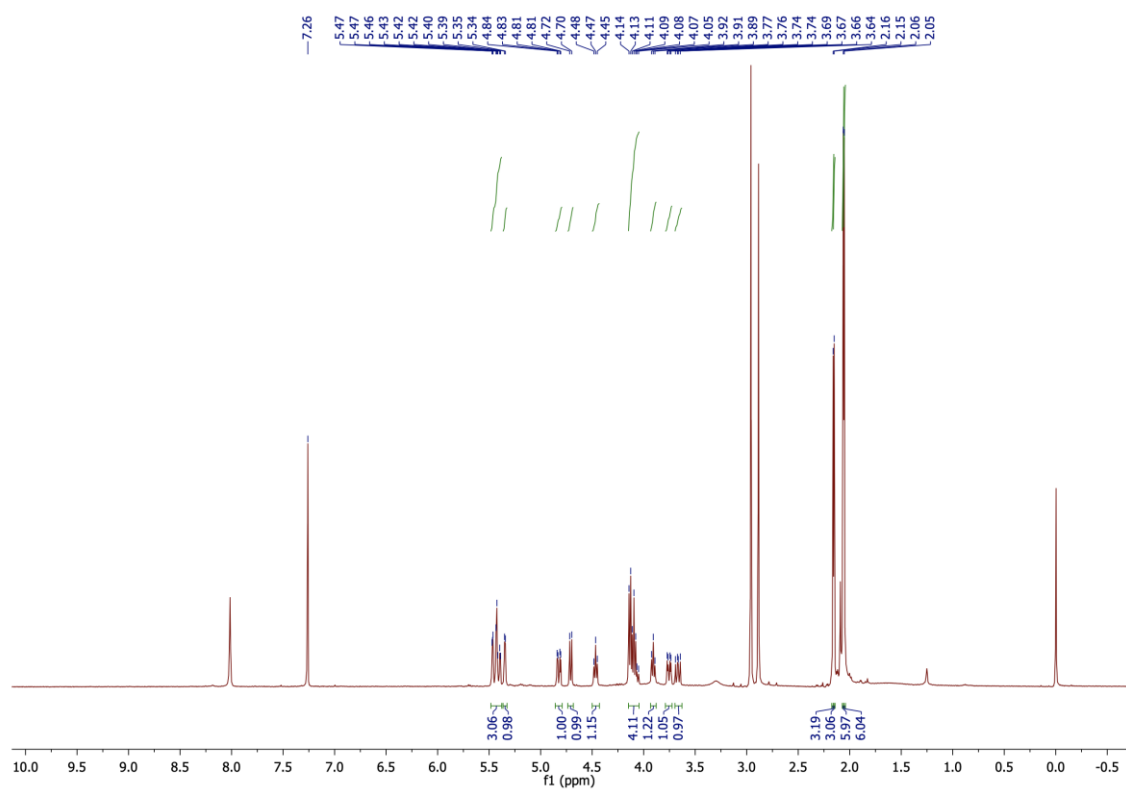


Figura 8. Espectro de ^1H RMN del compuesto 7.

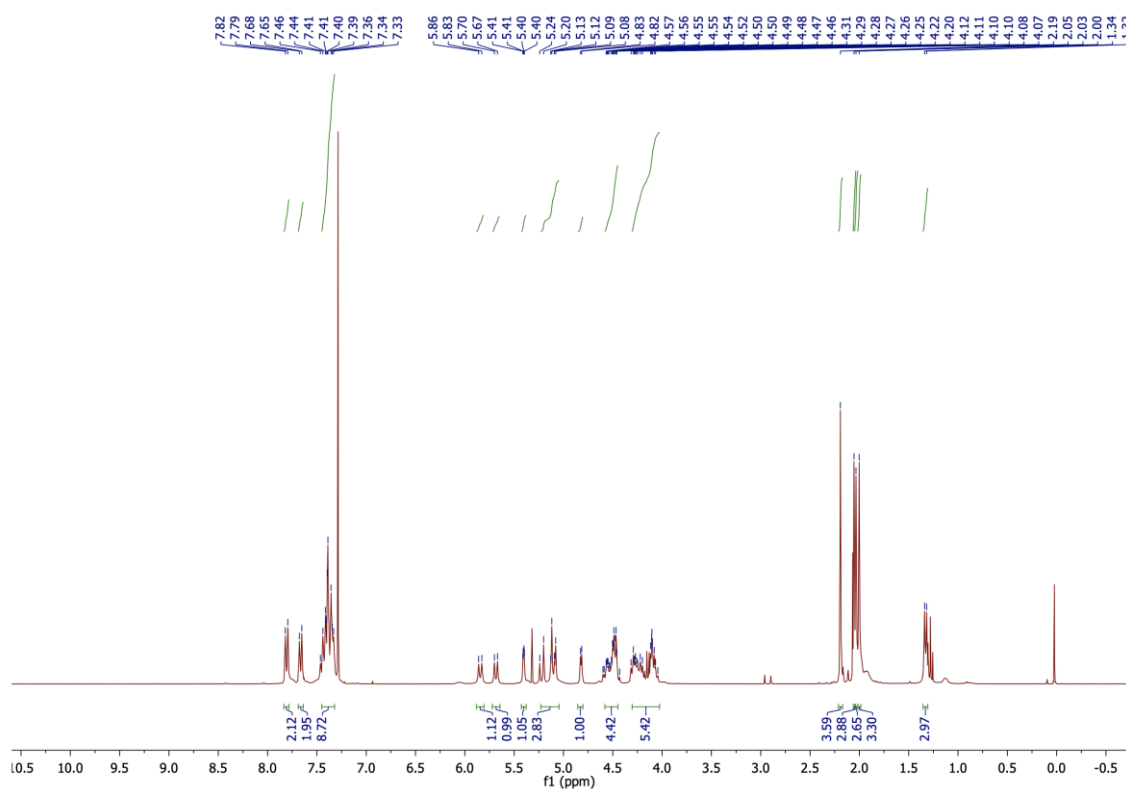


Figura 10. Espectro de ^1H RMN del compuesto 10a.

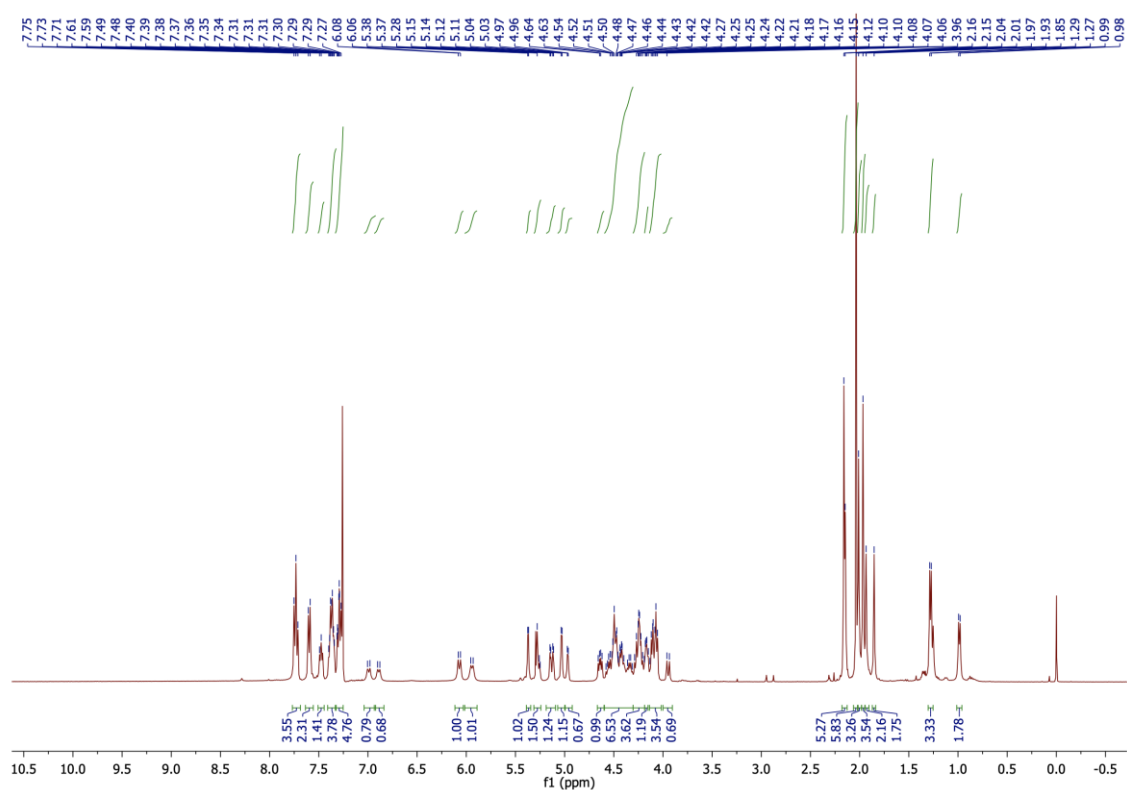


Figura 11. Espectro de ^1H RMN del compuesto **11**.

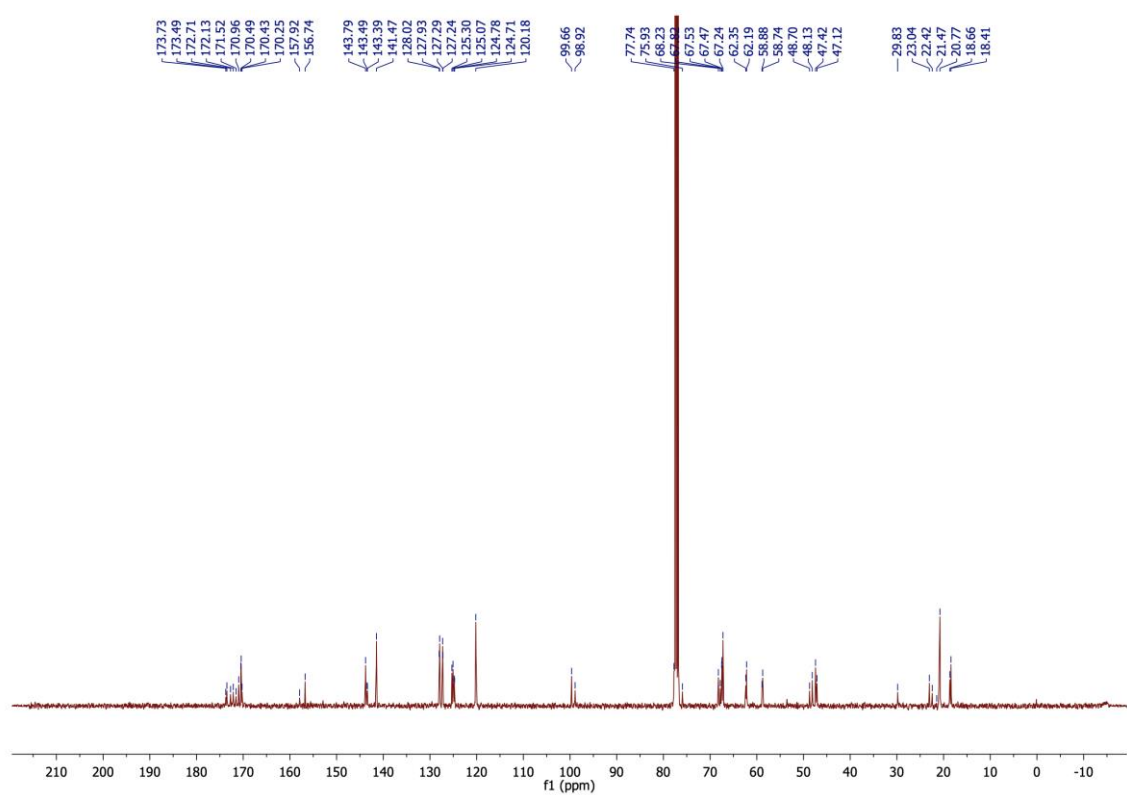


Figura 12. Espectro de ^{13}C RMN del compuesto **11**.

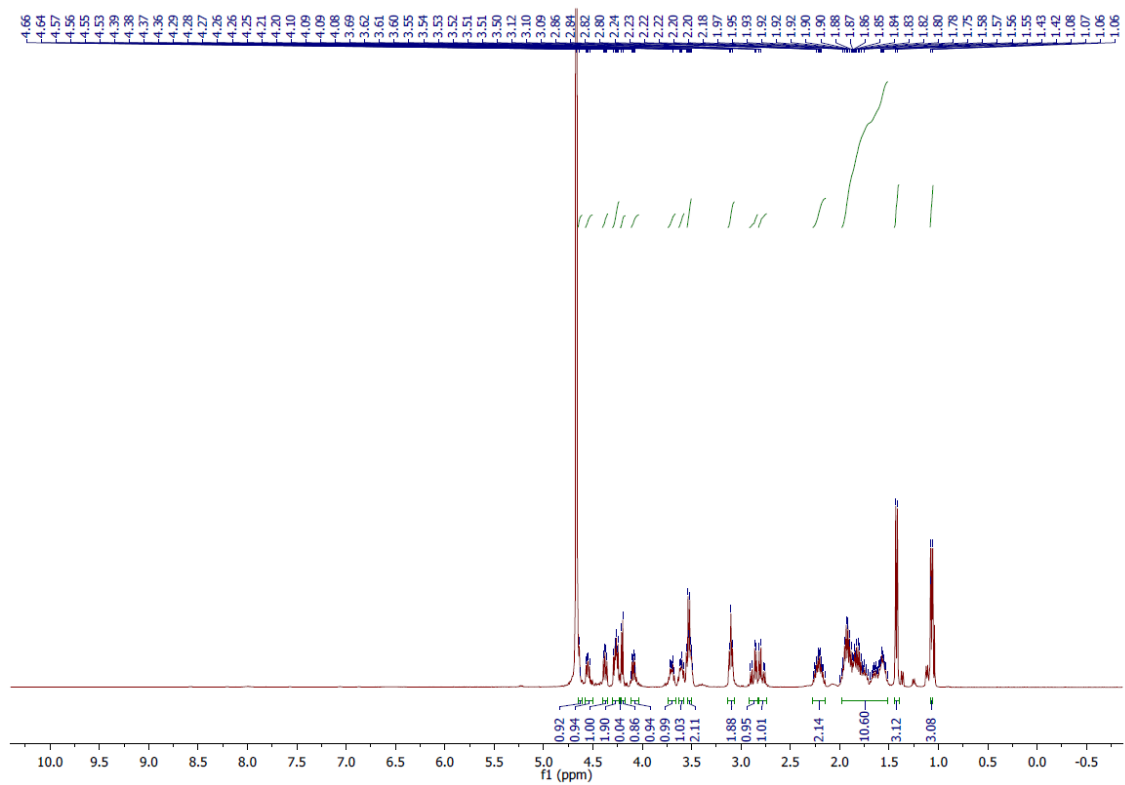


Figura 13. Espectro de ^1H RMN del péptido **APDTRP**.

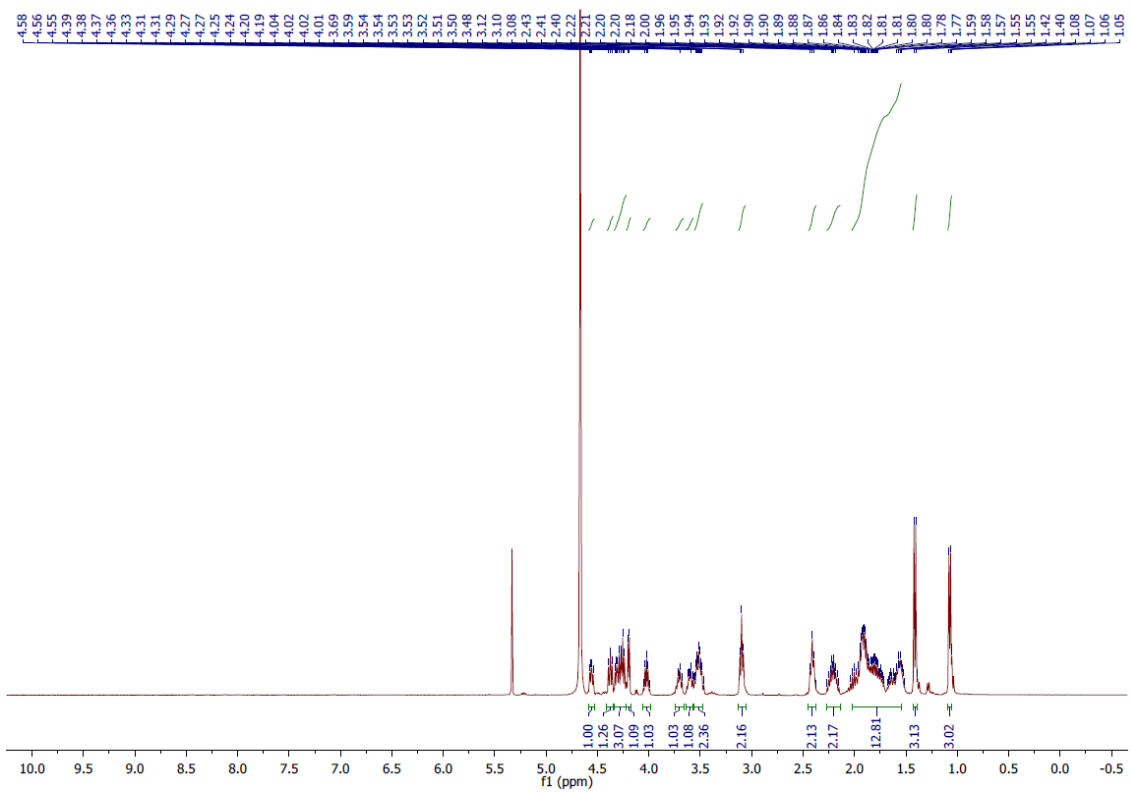


Figura 14. Espectro de ^1H RMN del péptido **APETRP**.